

OBECNOŚĆ ZANIECZYSZCZEŃ MUTAGENNYCH I CYTOTOKSYCZNYCH WE FRAKCJACH PM10 I PM2,5 AEROZOLU ATMOSFERYCZNEGO NA TERENIE MIASTA SOSNOWCA

MUTAGENIC AND CYTOTOXIC FACTORS IN PM10 AND PM2.5 FRACTIONS IN ATMOSPHERE IN SOSNOWIEC

Agnieszka Kozłowska^{1 (a, c, d, e, f)}, Elżbieta Olewińska^{1 (c, d, e, f)},
Agata Kowalska-Pawlak^{2 (a, b, f)}, Natalia Pawlas^{1 (c, d, e, f)}

¹ Zakład Szkodliwości Chemicznych i Toksykologii Genetycznej, Pracownia Toksykologii Genetycznej, Instytut Medycyny Pracy i Zdrowia Środowiskowego w Sosnowcu.

Kierownik Zakładu: dr hab. n. med. A. Sobczak.

Dyrektor IMPiZŚ: dr n. med. P.Z. Brewczyński

² Poradnia Genetyczna i Diagnostyki Prenatalnej z Pracownią Cytogenetyki i Genetyki Molekularnej w Zabrze
Kierownik: prof. dr hab. n. med. S. Zajczek

^(a) koncepcja

^(b) opracowanie wniosku grantowego (tematu statutowego)

^(c) zebranie materiału do badań

^(d) badania laboratoryjne

^(e) statystyka

^(f) opracowanie tekstu i piśmiennictwa

Streszczenie

Do badań cytotoksyczności pyłowych zanieczyszczeń aerozolu atmosferycznego wnikaających do organizmu przez układ oddechowy wykorzystywane są linie wyprowadzone z makrofagów oraz komórek nabłonkowych pęcherzyków płucnych. Mutagenne właściwości tych zanieczyszczeń można określić testem krótkoterminowym z wykorzystaniem szczepów bakterii *Salmonella typhimurium*.

Dla ekstraktów pyłowych zanieczyszczeń powietrza frakcji PM10 i PM2,5, pobieranych w sezonie jesiennym i zimowym na terenie Sosnowca zbadano mutagenność testem Ames z wykorzystaniem szczepów *Salmonella typhimurium* oraz cytotoksyczność za pomocą testu MTT z wykorzystaniem linii makrofagów mysich RAW 264.7. Próby pyłowych zanieczyszczeń powietrza były pobierane na filtry z włókna szklanego za pomocą impaktora Harvarda o przepływie powietrza wynoszącym ok. 9 l/min z rozdziałem frakcji na PM10 i PM2,5. Eks-

trakcję przeprowadzono chlorkiem metylenu a testowane próby przed analizami rozpuszczono w dimetylosulfotlenku (DMSO).

Najwyższą wartość współczynnika mutagenności (MR) uzyskano dla szczepu YG1041 + S9 frakcji PM10 z sezonu zimowego, natomiast najniższą wartość MR otrzymano dla szczepu TA98 – S9 frakcji PM2,5 z sezonu jesiennego. Ekstrakty pochodzące z sezonu zimowego frakcji PM10 i PM2,5 były toksyczne dla bakterii szczepu TA98 w obu wariantach ± S9. Test MTT z wykorzystaniem linii makrofagów mysich RAW 264.7 określił, że najbardziej toksyczna okazała się frakcja PM10 i PM2,5 z sezonu zimowego, gdzie przeżywalność komórek przy dawce 0,312 m³ kształtowała się odpowiednio 1,7% i 1,6%, podczas gdy dla tej samej dawki frakcji PM2,5 z sezonu jesiennego wynosiła 63%.

Słowa kluczowe: pył zawieszony, frakcja PM10, frakcja PM2,5, aktywność mutagenna, test Ames, cytotoksyczność, test MTT

Nadesłano: 28.09.2011

Zatwierdzono do druku: 14.11.2011

Abstract

Air dust pollution enters human body via respiratory system. Its cytotoxic effect is surveyed using cell lines of mononuclear or pulmonary epithelial cell origins. Mutagenic properties are assessed using short-term assay on *Salmonella typhimurium* bacterial strains.

Mutagenic and cytotoxic properties of air dust pollution – fractions PM10 and PM2.5, which were collected in autumn and in winter, were assessed using Ames test with *Salmonella typhimurium* strains and MTT cytotoxicity assay on mononuclear cell line RAW 264.7, respectively. Samples of dust were collected on glass fiber filters by (Harvard impactor) with air flow ca. 9 l/min, splitting samples to the fraction PM10 and PM2.5. Extraction of pollution was carried out using dichlorometane. Extracted samples were dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) before analyses.

The highest value of mutagenicity ratio (MR) was observed in YG1041 strain with metabolic activation by S9 extract in the PM10 sample of dust collected in winter. The lowest one was observed in TA98 strain without activation in the PM2.5 sample of dust collected in autumn. Winter dust samples, both the fractions PM10 and PM2.5, were toxic for TA98 strain in both test conditions (\pm S9). MTT cytotoxicity assay using mononuclear cell line RAW 264.7 showed that fractions PM10 and PM2.5 collected in winter were of highest toxic properties. The viability of cells, which were treated with samples of 0,312 m³ air, were 1,7% and 1,6%, respectively, while for autumn samples for PM2,5 the viability was 63%.

Key words: air dust, PM10, PM2.5, mutagenic activity, Ames test, cytotoxicity, MTT assay

Wstęp

Otoczającą nas przestrzeń życiową, a także nasze płuca wypełnia powietrze atmosferyczne. Rzadko zastanawiamy się nad jego składem. Często odczuwamy, że powietrze jest wilgotne czy suche, odczuwamy duszność związaną z dużą koncentracją CO₂ i brakiem tlenu, wyczuwamy też specyficzne substancje podrażniające nasz zmysł węchu. Poszczególne składniki powietrza – powszechnie wszystkim znane – mogą ulegać lokalnie czy globalnie pewnym odchyleniom od przyjętych wartości. Ich skład chemiczny, koncentracja, ilość i rodzaj uzależniony jest także od źródeł emisji i sposobu rozprzestrzeniania na różne odległości [1–3]. Mamy wtedy do czynienia z zanieczyszczeniem powietrza, czyli wprowadzeniem bezpośrednim lub pośrednim do atmosfery substancji stałych, ciekłych lub gazowych mogących ujemnie wpływać na otaczające nas środowisko, klimat, jakość wody, gleby czy zdrowie człowieka. Problemem zanieczyszczenia powietrza atmosferycznego przez frakcje pyłu PM10 i PM2,5 dotknięte są szczególnie obszary miejskie o wzmożonym ruchu pojazdów samochodowych, dużej gęstości zaludnienia, jak również rejonu o szczególnych warunkach topograficznych i klimatycznych sprzyjających gromadzeniu się cząstek w atmosferze, gdzie incydentalnie występują niekorzystne warunki aerosanitarne, którego konsekwencją jest pojawienie się smogu. Zawarte w powietrzu atmosferycznym frakcje PM10 i PM2,5 uwalniają się do atmosfery w procesach naturalnych przebiegających w przyrodzie oraz związanych z działalnością człowieka [4, 5].

Znaczna część zanieczyszczeń frakcji PM2,5 i PM10 dostaje się do atmosfery w procesach spalania paliw stałych. W dużym stopniu przyczynia się do tego również emisja z mieszkalnictwa (piece węglowe używane w gospodarstwach domowych), usług i sektora rolnego oraz stanowiąca coraz

większy problem przy gwałtownym rozwoju komunikacji emisja ze źródeł mobilnych czyli spalanie paliw płynnych w silnikach samochodowych (głównie silnikach Diesla), a także z tzw. pylenia wtórnego: podczas poruszania się pojazdów po nieutwardzonych nawierzchniach, ścierania powierzchni jezdni, opon i hamulców, rozdrabniania, kruszenia i unoszenia pyłu [4–14]. W miastach szczególną rolę w zanieczyszczeniu powietrza odgrywają małe, ale bardzo liczne obiekty zlokalizowane w zwartej zabudowie mieszkaniowej emitując substancje powstające podczas niepełnego spalania paliw w przestarzałych typach kotłów lub paleniskach indywidualnych. Ze względu na specyficzne uwarunkowania związane z zabudową w miastach i tworzenie się tzw. kanionów ulicznych oraz dużym natężeniem ruchu samochodowego występują częste przekroczenia dopuszczalnych poziomów stężeń zanieczyszczeń w powietrzu. Drobinę pyłu o średnicy mniejszej niż 2,5 μ m są transportowane na odległość (2500 km) i mogą pozostawać zawieszane w powietrzu nawet przez wiele tygodni. Są niebezpieczne dla zdrowia ludzi, wnikają one najgłębiej do dróg oddechowych osadzając się na powierzchni pęcherzyków płucnych [4, 15–17]. Natomiast frakcja PM10 utrzymuje się w powietrzu, co warunkuje prawdopodobieństwo dostania się do górnych odcinków układu oddechowego [6, 18–20]. Każda frakcja (PM10, PM2,5) aerozolu atmosferycznego zawiera niebezpieczne dla zdrowia substancje, głównie o budowie pierścieniowej, wykazujące właściwości mutagenne i cytotoksyczne [8, 12, 15, 16, 18, 20–24]. Substancjami o działaniu kancerogennym, mutagennym, rakotwórczym, cytotoksycznym i hepatotoksycznym są głównie wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA) [18, 24–28]. Ich niebezpieczne właściwości są zróżnicowane i wzrastają wraz z liczbą pierścieni w cząsteczce. Na pod-

stawie wyników otrzymanych w testach biologicznych można uzyskać wiarygodne wyniki odnośnie działania zanieczyszczeń na organizmy żywe. Badanie mutagenności powietrza zostało przeprowadzone już przez wielu badaczy w Polsce i na świecie [1, 4, 6–9, 11, 12, 15, 16, 18, 19, 21, 29–38]. Efekt mutageny pyłowych zanieczyszczeń powietrza powiązany jest głównie z zawartością w jego składzie wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych jako zanieczyszczeń, co potwierdzają badania przeprowadzone we Wrocławiu, Krakowie i na Górnym Śląsku [6, 9, 11, 12, 18, 19, 21, 24, 26, 29, 34, 39–41]. Poszukiwanie wskaźników wczesnych skutków biologicznych może skutecznie eliminować zagrożenia zdrowotne wywołane substancjami mutagennymi i kancerogennymi [7–9, 29, 42]. Większość związków chemicznych będących składnikami zanieczyszczającym powietrze atmosferyczne w różnorodny sposób działa na tkanki, narządy i układy budujące organizm człowieka powodując zwiększoną zachorowalność na choroby nowotworowe u osób zamieszkujących duże aglomeracje miejskie [9, 16, 17, 43].

Do badania mutagenności ekstraktów z pyłów frakcji PM10 i PM2,5 zastosowano krótkoterminowy bakteryjny test *in vitro* z wykorzystaniem szczepu *Salmonella typhimurium* [7, 8, 11, 18, 20, 31, 32, 37, 38]. Umożliwia on wykrywanie potencjalnych mutagenów i kancerogenów przy użyciu prostych organizmów. Dużą zaletą tego testu jest przeprowadzenie doświadczeń w krótkim czasie i szybkie oszacowanie wyników [20]. Test ten znalazł zastosowanie w zestawie testów stosowanych w toksykologii genetycznej jako pierwszy test krótkoterminowy [16].

Cel i zakres pracy

Celem pracy była ocena efektu mutagennego i cytotoksycznego pyłów (ang. particulate matter) o różnym rozmiarze cząstek – PM10 i PM2,5 ze szczególnym uwzględnieniem tych ostatnich. Do badań wykorzystano pył zawieszony frakcji PM10 i PM2,5 pobrany w sezonie jesiennym 2008 roku i zimowym 2008/2009 roku w Sosnowcu. Zakres badań obejmował pobór próbek pyłów, wykonanie ekstraktów pyłowych zanieczyszczeń frakcji PM10 i PM2,5, oraz określenie mutagenności testem Ames a i cytotoksyczności testem MTT poszczególnych frakcji w sezonie jesiennym i zimowym w Sosnowcu.

Materiały, metodyka poboru prób i obszar badań

Próby pyłowych zanieczyszczeń powietrza były pobierane w Sosnowcu w sezonie jesiennym (wrzesień–listopad 2008) i zimowym (grudzień–luty

2008/2009). Punkt pomiarowy usytuowany był na dachu budynku Instytutu Medycyny Pracy i Zdrowia Środowiskowego. Obszar badań posiada wszystkie cechy dużej aglomeracji miejskiej. Charakteryzuje się on w miarę zwartą wysoką zabudową (osiedla mieszkaniowe), oraz starą zabudową z niską emisją. Ponadto w pobliżu jest usytuowana dość gęsta sieć dróg o silnym natężeniu ruchu pojazdów samochodowych. Jest to więc obszar mający cechy typowego klimatu wielkomiejskiego charakteryzowanego poprzez: niską emisję, transport samochodowy, zanieczyszczenia miejskie. Czynnikiem, który w znacznym stopniu wpływa na efekt mutageny i cytotoksyczny prób powietrza jest okres ich pobierania, temperatura, skład chemiczny oraz miejsce poboru prób.

Do poboru prób pyłu zawieszzonego wykorzystano impaktor Harvarda o przepływie powietrza wynoszącym ok. 9 l/min. Dzięki niemu możliwe było rozfrakcjonowanie pyłu z aerozolu atmosferycznego na dwie frakcje, o średnicach poniżej 2,5 µm i powyżej 2,5 µm, lecz poniżej 10 µm (frakcja PM2,5 oraz frakcja PM10). Próby pobierano w sposób ciągły przez okres 3 miesięcy w sezonie jesiennym (od 5 września do 8 grudnia 2008 r.). W każdym miesiącu zmieniano filtr 3 razy (średnio co 10 dni). Uzyskując w ten sposób 9 filtrów z pyłowymi zanieczyszczeniami powietrza dla frakcji PM2,5 oraz 9 filtrów dla frakcji PM10. Pobór prób w sezonie zimowym obejmował okres od 9 grudnia 2008 r. do 8 marca 2009 r. Próby pobierano w analogiczny sposób jak w sezonie jesiennym. Następnie próbki pyłu, zebrane na filtrach z włókna szklanego, poddano analizie wagowej określającej masę pyłu poszczególnych frakcji na podstawie różnicy w masie filtra przed i po pobraniu próby. Dla każdego sezonu (jesiennego i zimowego) i odpowiednich frakcji pyłu utworzono próby zbiorcze łącząc 9 filtrów w jedną próbę i poddano ekstrakcji w aparacie Soxhleta przy użyciu dichlorometanu (Baker) przez 8 godzin z 30-minutowym refleksem w ciemności w pomieszczeniu z właściwą wentylacją (dygestorium). Uzyskane ekstrakty podzielono na porcje, zagęszczono w wyparce próżniowej (UNIPAN-PRO) i odparowano do sucha w atmosferze azotu. Suchą pozostałość rozpuszczono w dimetylosulfotlenku (DMSO) i wykorzystano w teście Ames a oraz teście MTT.

Metodyka badań mutagenności – Test Ames a

Test Ames a przeprowadzono zgodnie z zaleceniami autorów [44] uwzględniając doświadczenia naukowe własne oraz innych [1, 6, 12, 16, 18, 20, 23, 26, 31–34, 39–41, 44–48]. Oparty jest on na wykorzystaniu zdolności bakterii do rewersji mutacji,

pod wpływem czynników wywołujących mutację powrotną. Histrydino-zależne auksotroficzne mutanty bakterii *Salmonella typhimurium* ulegają rewersji do form prototroficznych.

Zgodnie z procedurą [44] do sterylnych probówek umieszczonych w łaźni wodnej wprowadzono kolejno: odpowiednią ilość badanego ekstraktu powietrza rozpuszczonego w DMSO (Sigma-Aldrich), 0,1 cm³ zawiesiny bakteryjnej, 2,5 cm³ top agaru (Oxoid), uzupełnionego śladowymi ilościami chlorowodoru L-histrydiny i biotyny (Sigma-Aldrich), 0,5 cm³ S9-mix (Trinova-Biochem) w wariancie z aktywacją metaboliczną (+S9). Zawartość probówek dokładnie wymieszano i wylano na powierzchnię płytki zawierającej agar minimalny. Płytki poddano inkubacji w temp. +37° C przez 48 godzin dla szczepu TA98 oraz 72 godziny dla szczepu YG1041, a następnie liczono kolonie historydino-niezależnych rewertantów przy pomocy automatycznego licznika kolonii Protos.

Badania efektu mutagennego przeprowadzono z wykorzystaniem szczepu TA98 i jego pochodnej YG1041 w dwóch wariantach: z aktywacją metaboliczną (+S9) oraz bez aktywacji metabolicznej (bez udziału frakcji S9). Przemiany metaboliczne związków promutagennych do mutagenów przeprowadzono w obecności enzymów oksydacyjnych, zawartych w homogenacie z wątroby szczura (frakcja mikrosomalna S9). Przed wykonaniem doświadczeń sprawdzono genotypy szczepów testowych, określając ich liczbę rewertantów spontanicznych oraz indukowanych przez mutageny diagnostyczne. Mutagenami diagnostycznymi dla przeprowadzonych badań bez aktywacji metabolicznej były: 4-Nitroquinoline-N-Oxide (Sigma-Aldrich) oraz 1-nitropiren (Fluka) natomiast dla badań przeprowadzonych w obecności frakcji mikrosomalnej S9 były: benzo(a)piren (Fluka) i 2-aminofluoren (Fluka).

Dobór dawek dokonany został w badaniach wstępnych oraz ustalony na podstawie wcześniejszych doświadczeń. Ekstrakty pyłów zawieszonych frakcji PM10 i PM2,5 badano za pomocą szczepu TA98 w dawkach odpowiadających 2,5; 5,0 oraz 10,0 m³ powietrza/płytkę. W przypadku szczepu YG1041 zastosowano dawki 4-krotnie niższe 0,625; 1,25 oraz 2,5 m³ powietrza/płytkę.

Do obliczenia efektu mutagennego badanych ekstraktów pyłowych zanieczyszczeń powietrza wykorzystano program STATISTICA. Z otrzymanych wyników dla 2,5; 5,0 i 10,0 m³ oraz 0,625; 1,25 i 2,5 m³ odpowiednio dla szczepu TA98 i YG1041, wykreślono przebieg funkcji opisującej zależności dawka – odpowiedź. W przypadku liniowej zależności spełniającej definicję mutagenności [44] z otrzymanego równania regresji liniowej odczytano współczynnik mutagenności dla 1 m³.

Skategoryzowano dane ze względu na rodzaj frakcji, zastosowany szczep z rozróżnieniem na wariant bez aktywacji metabolicznej (–S9) oraz z aktywacją metaboliczną (+S9). Próbę uznano za mutagenną, jeżeli współczynnik mutagenności (MR) jest równy lub większy od 2.

Metodyka badań cytotoksyczności – Test MTT

Badania cytotoksyczności ekstraktów z pyłów zawieszonych frakcji PM10 i PM2,5 prowadzono na liniach komórkowych RAW 264.7 (ATCC, Manassas, VA 20110-2209, USA) zatwierdzonych i zarejestrowanych w Amerykańskiej Kolekcji Hodowli Komórek (ATCC – ang. *American Type Culture Collection*).

Metodyka testu MTT [49, 50] na liniach RAW 264.7 została zoptymalizowana w Zakładzie Toksykologii Genetycznej na podstawie własnych doświadczeń oraz danych literaturowych [51, 52]. Wszystkie doświadczenia prowadzono w sterylnej atmosferze, w komorze z przepływem laminarnym, i inkubatorze CO₂ przy zapewnieniu odpowiedniego środowiska wzrostu o optymalnej temperaturze (37° C), wilgotności (95%) i stężeniu CO₂ (5%) oraz niezbędnych do życia i proliferacji składników odżywczych: medium DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, ATCC) uzupełnionym 10% termicznie inaktywowaną płodową surowicą bydlęcą (Gibco) i 1% mieszaniną antybiotyków penicyliny i streptomycyny (PNS, ATCC). Eksperymenty prowadzono na 13–19 pasażu. Metoda testu polegała na ilościowym kolorymetrycznym oznaczeniu barwnego produktu – formazanu, powstającego po dodaniu bromku 3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenyloctetrazolu (MTT) do zawiesiny hodowlanej zawierającej ekstrakty pyłowych zanieczyszczeń powietrza poszczególnych frakcji. Przekształcenie soli tetrazolowych (MTT) o żółtym zabarwieniu do fioletowo zabarwionego, nierozpuszczalnego w wodzie formazanu przebiega w mitochondriach w żywych, aktywnych metabolicznie komórkach [49, 50]. Jeżeli komórki zostały wcześniej uszkodzone lub zniszczone przez toksynę, to reakcja ta jest mniej intensywna lub nie zachodzi w ogóle, co można stwierdzić po zmianie barwy i oznaczyć spektrofotometrycznie [51, 52]. Ekstrakty pyłów rozpuszczono w DMSO (Sigma-Aldrich) i przygotowano bardzo szeroki wachlarz stężeń pyłu poszczególnych frakcji: 1,0; 0,875; 0,750; 0,625; 0,500; 0,437; 0,375; 0,312; 0,250; 0,187; 0,125; 0,062; 0,031; 0,015; 0,001 m³. Test MTT jest metodą służącą do szybkiej, ilościowej oceny próby. Nie daje informacji o rodzaju występujących toksyn, ale o ich biologicznych skutkach w postaci cytotoksyczności.

Każde badane stężenie pyłów zawieszonych dla poszczególnych frakcji i sezonów testowano w ośmiu powtórzeniach. Następnie obliczono średnią arytmetyczną (z 8 powtórzeń) dla każdej kontroli i poszczególnych stężeń. Przeżywalność (P) makrofagów określono w stosunku do ich przeżywalności w próbkach kontrolnych zgodnie ze wzorem [53]:

$$P = \frac{\text{absorbancja próby}}{\text{absorbancja kontroli}} \cdot 100\%$$

Absorbancja to inaczej gęstość optyczna (ang. *Optical Density*; OD), odpowiadająca ilości komórek, które przeżyły inkubację z badanym stężeniem pyłów zawieszonych lub ilości komórek w próbce kontrolnej.

Wartość LC50 (stężenie związku chemicznego przy którym występuje 50% inhibicja wzrostu komórek lub redukcja przeżywalności komórek) obliczono z krzywej dawka – odpowiedź (zastosowane stężenia – przeżywalność). Na podstawie liniowej zależności wyznaczono trzy wielkości stanowiące podstawę do oceny cytotoksyczności badanych ekstraktów pyłowych zanieczyszczeń powietrza [54].

- LC10 – stężenie testowanej frakcji pyłu zawieszzonego przy którym proliferacja komórek w hodowli zostaje zahamowana o 10% w stosunku do komórek kontrolnych – tzw. pierwsza dawka toksyczna,
- LC50 – stężenie testowanej frakcji pyłu zawieszzonego przy którym proliferacja komórek w hodowli zostaje zahamowana o 50% w stosunku do komórek kontrolnych – tzw. miara cytotoksyczności,

- LC90 – stężenie testowanej frakcji pyłu zawieszzonego przy którym proliferacja komórek w hodowli zostaje zahamowana o 90% w stosunku do komórek kontrolnych – tzw. dawka letalna (śmiertelna).

Jako miarę skupienia w analizach statystycznych stosowano średnią arytmetyczną wraz z odchyleniem standardowym. Do obliczenia przeżywalności wykorzystano średnie arytmetyczne otrzymanych wyników absorbancji. Do dalszej analizy zastosowano analizę wariancji.

Wyniki badań i dyskusja

Dane dotyczące frakcji pyłu PM_{2,5} i PM₁₀ w okresie poboru prób

Sosnowiec jest miastem (218.422 mieszkańców – stan na dzień 30.06.2010 r.) zlokalizowanym na obszarze województwa śląskiego należącego do regionów o największej emisji zanieczyszczeń pyłowo-gazowych. Rodzaj oraz ilość spalanych paliw w procesach technologicznych wpływa na ilość zanieczyszczeń emitowanych do atmosfery.

W tabeli I zaprezentowano dane dotyczące poboru poszczególnych frakcji pyłu w sezonie jesiennym i zimowym w Sosnowcu. Otrzymana ilość pyłu poszczególnych frakcji była zbliżona do wartości zmierzonych w okresie jesienno-zimowym na obszarze Dolnego i Górnego Śląska oraz miast europejskich co potwierdzają dane literaturowe [5, 16, 20, 22, 35, 36, 55–57].

Tabela I. Zestawienie danych dotyczących próbek pyłu frakcji PM_{2,5} i PM₁₀

Table I. Data on PM_{2.5} and PM₁₀ fractions in collected samples

Rodzaj próby – frakcja/sezon	Okres poboru	Objętość powietrza [m ³]	Masa pyłu [mg]	Stężenie pyłu [µg/m ³]
PM _{2,5} /jesień	IX – XII 2008	3520,48	126,05	35,80
PM ₁₀ /jesień	IX – XII 2008	3054,19	168,08	50,49
PM _{2,5} /zima	XII 2008 – III 2009	2963,92	187,75	63,34
PM ₁₀ /zima	XII 2008 – III 2009	2932,20	227,82	77,69

Najwyższą zależność pomiędzy objętością pobranego powietrza a masą pyłu zaobserwowano w sezonie zimowym w przypadku frakcji PM_{2,5} oraz PM₁₀. Największe stężenie pyłu w przeliczeniu na 1 m³ uzyskano na filtrach z frakcji PM₁₀ w sezonie

zimowym, wynosiło ono 77,69 µg/m³ i było o 1,5 razy wyższe niż w sezonie jesiennym. Podobnie zaobserwowano dla frakcji PM_{2,5}, gdzie w sezonie zimowym stężenie pyłu w 1 m³ wynosiło 63,34 µg/m³ i było 1,8 razy wyższe niż w sezonie jesiennym.

Wyniki testu Amesa

Efekt mutageny oceniono na podstawie współczynnika mutagenności (MR), który jest ilorazem liczby netto kolonii rewertantów do liczby rewertantów spontanicznych. Próbę uznano za mutageną jeśli $MR \geq 2,0$ i istniała liniowa zależność dawka – odpowiedź. Przeanalizowano efekt mutageny pod względem zmienności sezonowej, oraz zależności dawka – odpowiedź, a także zależności pomiędzy frakcją PM10 a PM2,5.

Analizując próbki pyłów pochodzące z sezonu jesiennego dla szczepu TA98 stwierdzono brak za-

leżności dawka – odpowiedź dla PM₁₀ bez aktywacji metabolicznej (–S9). Próba wykazywała efekt toksyczny. Gdy zastosowano egzogenny system aktywacji metabolicznej (+S9) uzyskano zależność dawka – odpowiedź zarówno dla PM₁₀ jak i PM_{2,5}. W sezonie jesiennym szczep TA98 był bardziej efektywny w wykrywaniu substancji mutagennych w wariancie z aktywacją metaboliczną. Badane ekstrakty z sezonu jesiennego wykazały bardzo wysoki współczynnik mutagenności również w przypadku szczepu YG1041 zarówno z aktywacją jak i bez aktywacji metabolicznej (tab. II).

Tabela II. Współczynnik mutagenności (MR) dla szczepu TA98 i YG1041 w sezonie jesiennym i zimowym dla frakcji PM10 oraz PM2,5

Table II. Mutagenicity ratio (MR) in TA98 and YG1041 strains in winter and autumn samples in PM10 and PM2.5 fractions

		Współczynnik mutagenności dla TA98 (w przeliczeniu na 1 m ³ powietrza)		Współczynnik mutagenności dla YG1041 (w przeliczeniu na 1 m ³ powietrza)	
		S9 (–)	S9 (+)	S9 (–)	S9 (+)
Jesień	PM _{2,5}	7,6	16,9	10,4	10,3
	PM ₁₀	Efekt toksyczny	10,1	7,8	12,6
Zima	PM _{2,5}	Efekt toksyczny	Efekt toksyczny	8,9	20,5
	PM ₁₀	Efekt toksyczny	Efekt toksyczny	9,6	20,6

Zastosowane dawki badanych frakcji pyłu pobrane zimą wykazały efekt toksyczny na komórki bakteryjne szczepu TA98 w wariantach \pm S9. Natomiast szczep YG1041 w obu wariantach wykazuje wysoki współczynnik mutagenności (tab. II). Dla frakcji PM_{2,5} w wariancie +S9 współczynnik MR jest 2,5 razy wyższy w stosunku do S9. Natomiast frakcja PM10 cechuje się 2,1 razy wyższym współczynnikiem MR w wariancie +S9 niż w wariancie –S9. Szczep YG1041 okazał się bardziej skuteczny w wykrywaniu mutagennego działania pyłów frakcji PM10 i PM_{2,5} niezależnie od sezonu poboru prób oraz zastosowanego wariantu testu (\pm S9) wszystkie próby (100%) były silnie mutagenne ($MR > 2$).

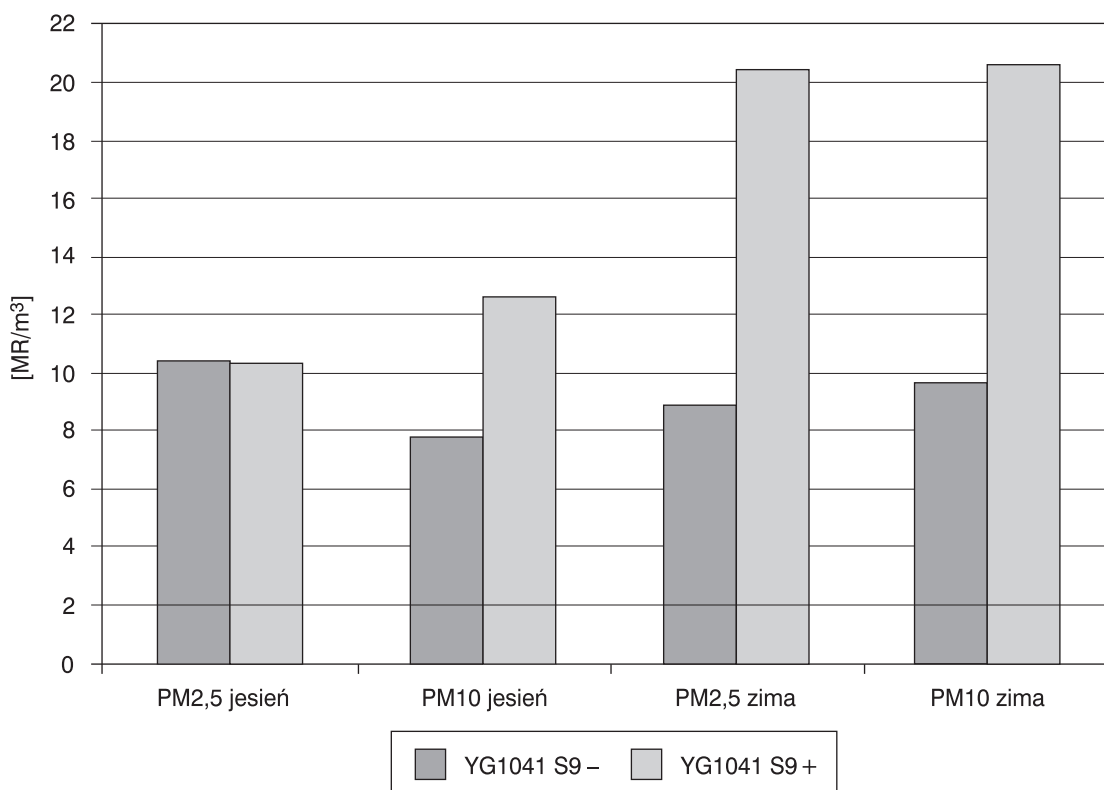
Analizując zmienność sezonową stwierdzono, że próbki pyłów pochodzące z sezonu zimowego cechowały się znaczną aktywnością mutageną w przypadku szczepu YG1041. Zarówno frakcja PM10 jak i PM_{2,5} po zastosowaniu S9 wykazują dużo wyższe współczynniki mutagenności niż te same frakcje w sezonie jesiennym (ryc. 1). Poziom aktywności mutagennej wykrywanej szczepem YG1041 nie zależał od sezonu poboru próbki ponieważ we wszystkich badanych ekstraktach obserwowano bardzo wysokie wartości współczynnika

mutagenności ($MR > 2$) w przeliczeniu na 1 m³ powietrza.

Możliwość analizowania efektu mutagennego pyłów pod względem wrażliwości na mechanizm działania poszczególnych mutagenów było prowadzone przez wielu naukowców przy zastosowaniu połączenia szczepów testowych Salmonella typhimurium TA98 i YG1041. Szczep YG1041 jest bardzo czuły w wykrywaniu mutagenów działających bezpośrednio (np. NWWA), nie wymagających aktywacji metabolicznej jak i działających pośrednio (z frakcją S9). Wykrywanie nitrowych pochodnych WWA jest bardziej skuteczne dzięki plazmidowi pYG233 oraz zwielokrotnionej kopii genów: nitroreduktazy i O-acetylotransferazy. Liczba kolonii rewertantów indukowana przez ekstrakty pyłowych zanieczyszczeń powietrza frakcji PM10 i PM_{2,5} badana szczepem YG1041 była wyższa w zimie, zwłaszcza w wariancie z aktywacją, co świadczy nie tylko o ilościowych różnicach między sezonami, ale również o zmianach jakościowych mieszaniny mutagennej, jaką jest ekstrakt pyłów zawieszonych. Jest to dowód na to, że w składzie ekstraktów pochodzących z tego sezonu znajduje się więcej nitrowych związków aromatycznych. Może to być

spowodowane usytuowaniem punktu pomiarowego przy ulicy o znacznym natężeniu ruchu w pobliżu przystanku autobusowego. NWWA powstają głównie ze spalania paliw w silnikach Diesla. W sezonie zimowym 1 m³ powietrza jest bardziej mutageny,

zatem powietrze jest znacznie bardziej zanieczyszczone niż w sezonie jesiennym. Może to wynikać z faktu iż w pobliżu znajdują się punkty niskiej emisji zanieczyszczeń z ogrzewanych/opalanych mieszkań.



Rycina 1. Mutageność frakcji PM10 i PM2,5 w sezonie jesiennym i zimowym wykrywana szczepem YG1041

Figure 1. Mutagenicity ratio of PM10 and PM2,5 fractions collected in autumn and winter assessed in YG1041 strain

W badanych frakcjach pyłu pochodzących z Sosnowca obecne były zarówno związki o charakterze mutagenów bezpośrednich i pośrednich. Mutageny zawarte we frakcjach PM2,5 i PM10 w powietrzu w sezonie jesiennym, wywoływały istotną statystycznie odpowiedź ze strony szczepu TA98 (próby były mutagenne), co oznacza, że były to głównie związki wywołujące mutacje typu zmiany fazy odczytu. Wyniki przeprowadzonych badań mutagenności wykazały, że aktywacja przy pomocy enzymów mikrosomalnych powodowała istotny wzrost odpowiedzi mutagennej szczepu TA98 w odniesieniu do frakcji PM2,5 i PM10 z sezonu jesiennego co dowodzi, iż w powietrzu atmosferycznym w sezonie jesiennym występowała przewaga mutagenów działających pośrednio w tym WWA. Działanie mutagenów takich jak aminy aromatyczne, hydroksyloaminy, tlenowe pochodne WWA dały odpowiedź aktywności mutagennej powyżej 2 tylko w przypadku frakcji PM2,5 z sezonu jesiennego.

W sezonie zimowym frakcja PM2,5 i PM10 wykazała efekt toksyczny w stosunku do szczepu TA98 w obu wariantach aktywacji. Przeprowadzony test Ames wykazuje dużą czułość ze strony szczepu YG1041 na wykrywanie mutagenów zawartych w ekstraktach pyłów. Jest to dowód na to, że w składzie ekstraktów pochodzących z sezonu jesiennego i zimowego znajduje się duża ilość nitrowych związków aromatycznych. W badanym zakresie stężeń zanieczyszczeń frakcji PM10 i PM2,5 (0,625 do 2,5 m³) zaobserwowano dla tego szczepu wyraźną zależność dawka – odpowiedź co w pełni ilustrowało mutagenność poszczególnych frakcji pyłu zarówno w obecności jak i bez udziału egzogenego systemu aktywacji metabolicznej S9.

Zastosowanie szczepu YG1041 razem ze szczepem standardowym TA98 pozwoliło na rozpoznanie związków odpowiedzialnych za efekt mutageny pyłów frakcji PM10 i PM2,5 w powietrzu na terenie

Sosnowca. Wnioskować można zatem, że mutagenne działanie pyłowych zanieczyszczeń powietrza na bakterie szczepu *Salmonella typhimurium* w dużej mierze spowodowane jest wysoką zawartością wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w badanym powietrzu. Próby pobrane w okresie zimowym były bardziej mutagenne, niż frakcje z sezonu jesiennego co pokrywa się z wynikami innych badaczy [16, 32, 37]. Wyższe wartości współczynnika mutagenności uzyskano w wariancie +S9. Najwyższe wartości MR dla 1 m³ uzyskano dla frakcji PM10 z sezonu zimowego.

Wyniki testu MTT

Dla poszczególnych prób (frakcji) uzyskane wyniki przeżywalności komórek makrofagów mysich RAW 264.7 eksponowanych na stosowane dawki pyłowych zanieczyszczeń powietrza przedstawiono na rycinach 2–5.

Analizując przeżywalność makrofagów kontaktujących się z ekstraktami pyłowych zanieczyszczeń powietrza można wnioskować iż występuje zróżnicowanie między badanymi frakcjami, co można również zaobserwować w przeżywalności makrofagów w stosunku do zastosowanej dawki pyłowych zanieczyszczeń (ryc. 2–5). Największe zróżnicowanie pomiędzy frakcjami zaobserwowano dla dawki 0,312 m³ przy której dla frakcji PM2,5 w sezonie jesiennym stwierdzono przeżywalność na poziomie 63% ± 20 (ryc. 2), a przeżywalność dla frakcji PM10 w tym samym sezonie wyniosła 119% ± 10 (ryc. 3). Natomiast dla tej samej dawki w sezonie zimowym zarówno dla PM2,5 jak i PM10 przeżywalność wahała się w odpowiednio 1,6% ± 0,3 (ryc. 4), oraz 1,7% ± 0,4 (ryc. 5).

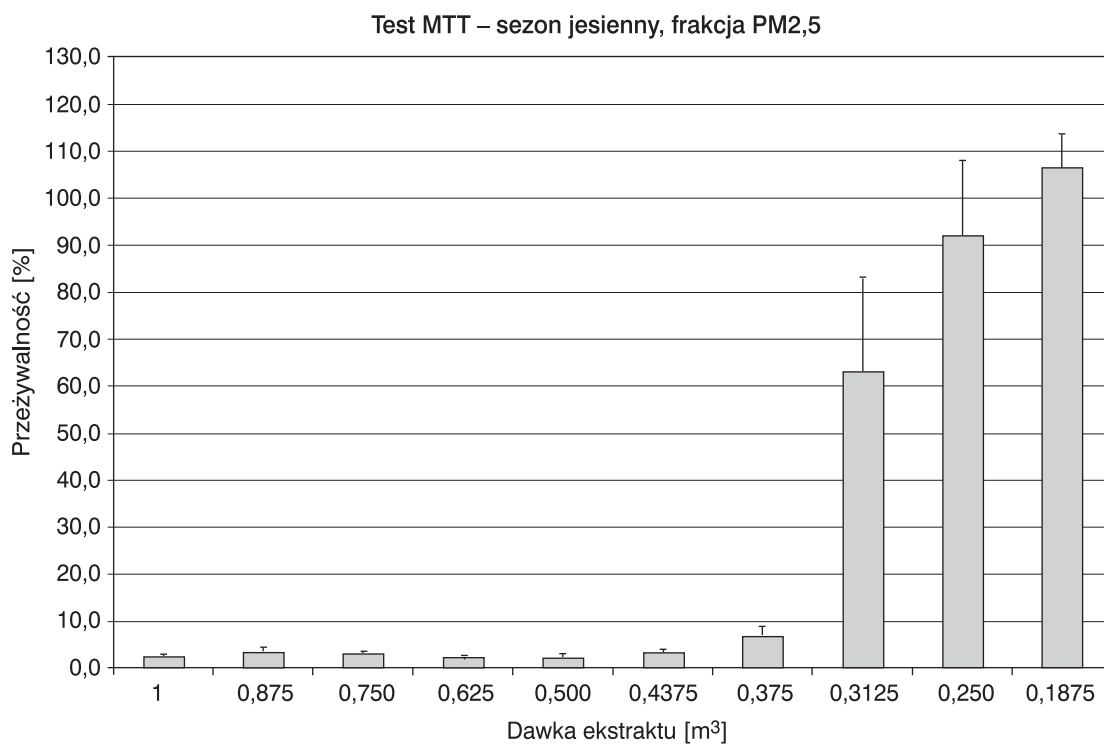
Za miarę cytotoksyczności przyjęto wartość LC=50, której nie udało się uzyskać dla żadnego sezonu ani frakcji. Tylko w przypadku dwóch frakcji: PM2,5 z sezonu jesiennego (dla dawki 0,312 m³ badanego ekstraktu) oraz PM10 z sezonu jesiennego (dla dawki 0,375 m³ badanego ekstraktu) uzyskano przybliżone wartości odpowiednio 63% i 65% przeżywalności komórek. W prezentowanych badaniach dla dawek od 1 m³ do 0,437 m³ w przypadku wszystkich testowanych prób stwierdzono bardzo niską przeżywalność komórek w granicach 1,8–6,0%, co świadczy, że dawki pyłowych zanieczyszczeń powietrza powodują bardzo toksyczne działanie na linii makrofagów mysich (ryc. 2–5). W zakresie dawek od 0,375 m³ do 0,001 m³ zaobserwowano w zależności od frakcji wszystkie przyjęte kryteria oceny cytotoksyczności. Dla frakcji PM2,5 w sezonie jesiennym otrzymane wyniki mieszczą się w zakresie LC90 – dawka letalna do LC10 – pierwsza dawka toksyczna. Dla frakcji PM10 w sezonie jesiennym przy dawce 0,375 m³ uzyskano

wartość zbliżoną do LC50, natomiast pozostałe dawki nie mają wpływu na komórki makrofagów. Pyły pobrane w sezonie zimowym zarówno dla frakcji PM2,5 jak i PM10 działają bardzo toksycznie w przypadku analizowanych dawek, nie mają wpływu na testowane komórki makrofagów mysich, albo powodują zahamowanie proliferacji komórek w hodowli w granicy 10%.

W badaniach prowadzonych w Polsce i na świecie coraz częściej zwraca się uwagę na ocenę szkodliwego działania pyłowych zanieczyszczeń powietrza na organizm ludzki, a w związku z tym rozpatrywanie wyników mutagenności w powiązaniu z oceną ich toksyczności i cytotoksyczności [53, 58, 59]. Mutagenne i cytotoksyczne substancje w tym pyły i ich poszczególne frakcje wnikają do organizmu przez układ oddechowy, gdzie w poszczególnych jego piętach są akumulowane i osiągają duże stężenia. Mogą być przyczyną wywołania mutacji, której istotą są nieodwracalne uszkodzenia w materiale genetycznym komórki, prowadzące do zmiany jej funkcjonowania [53].

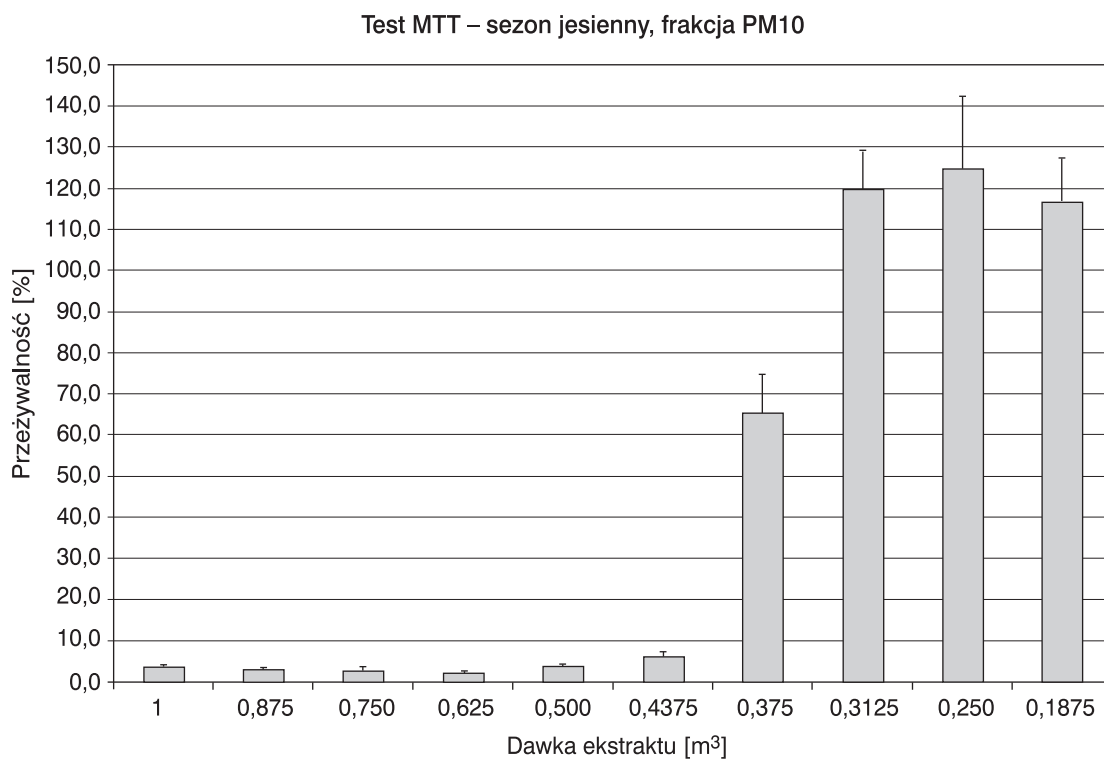
W badaniach substancji wnikających do organizmu człowieka przez układ oddechowy wykorzystano linie wyprowadzone z makrofagów oraz komórek nabłonkowych pęcherzyków płucnych. Badania cytotoksyczności pyłowych zanieczyszczeń powietrza w Polsce były prowadzone głównie na liniach ludzkich komórek raka płuc A549 [9, 15, 16, 18, 34, 39, 43]. Linia makrofagów mysich RAW 264.7 była również stosowana do oceny cytotoksyczności cząstek respirabilnych co potwierdzono w badaniach *in vitro* [34, 51, 53, 58, 59].

W prezentowanych badaniach stwierdzono bardzo toksyczne działanie poszczególnych frakcji pyłu pobranych w okresie jesienno-zimowym na komórki makrofagów mysich RAW 264.7. Stężenia poszczególnych frakcji pyłów wywołujące efekt toksyczny wahały się różnie w zależności od sezonu poboru próbki. Podobnie jak miało to miejsce we Wrocławiu, gdzie badania przeprowadzono w różnych porach roku [4, 5]. Zarówno w Sosnowcu jak i we Wrocławiu silniejszy efekt toksyczny uzyskano dla prób pochodzących z sezonu zimowego [16, 18, 34, 53]. Badania cytotoksyczności prowadzone w różnych częściach świata przez innych badaczy potwierdzają, iż najbardziej cytotoksyczne są frakcje pyłowych zanieczyszczeń powietrza o rozmiarze cząstek poniżej PM2,5 a także te pochodzące z sezonu zimowego [51, 52, 59]. Z przeprowadzonych analiz można wnioskować, iż usytuowanie punktu pomiarowego w pobliżu ruchliwej drogi, przystanku autobusowego oraz budynków z niską emisją dało odpowiedź w postaci mutagennych i cytotoksycznych właściwości poszczególnych frakcji PM10 i PM2,5 w sezonie jesiennym i zimowym oraz podwyższone



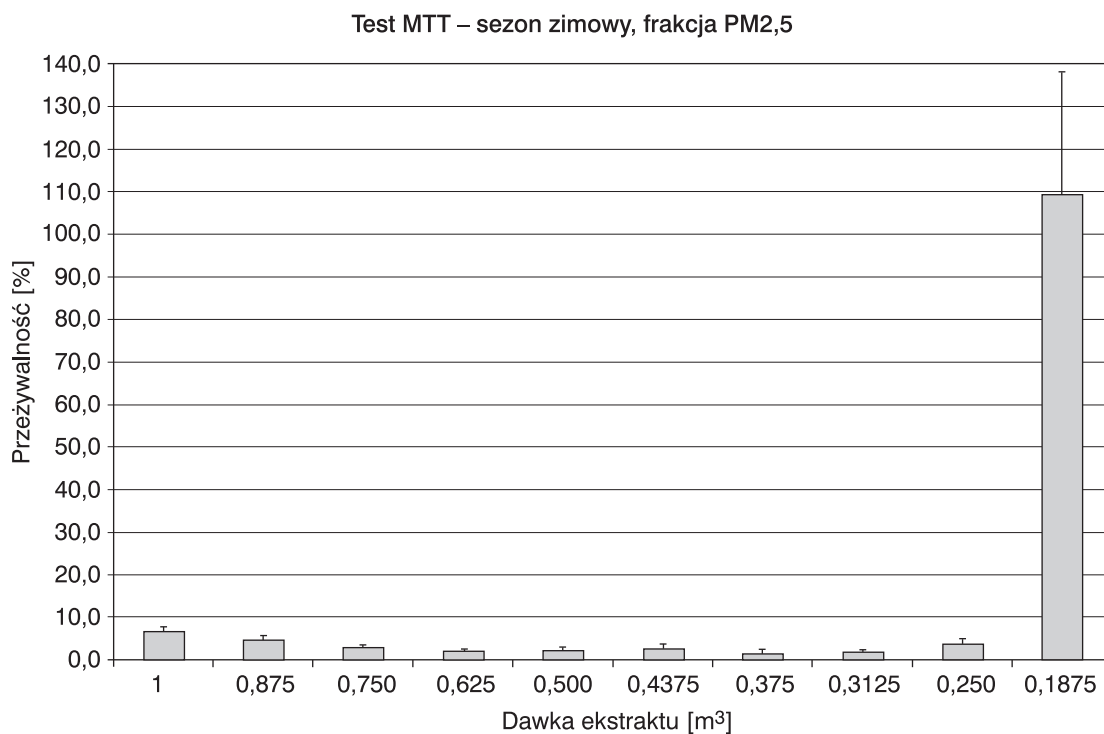
Rycina 2. Wyniki testu MTT oszacowane w zależności od dawki ekstraktu pyłowych zanieczyszczeń powietrza frakcji PM2,5 pobranego w sezonie jesiennym

Figure 2. MTT assay results of PM2.5 fraction of dust extracts collected in autumn



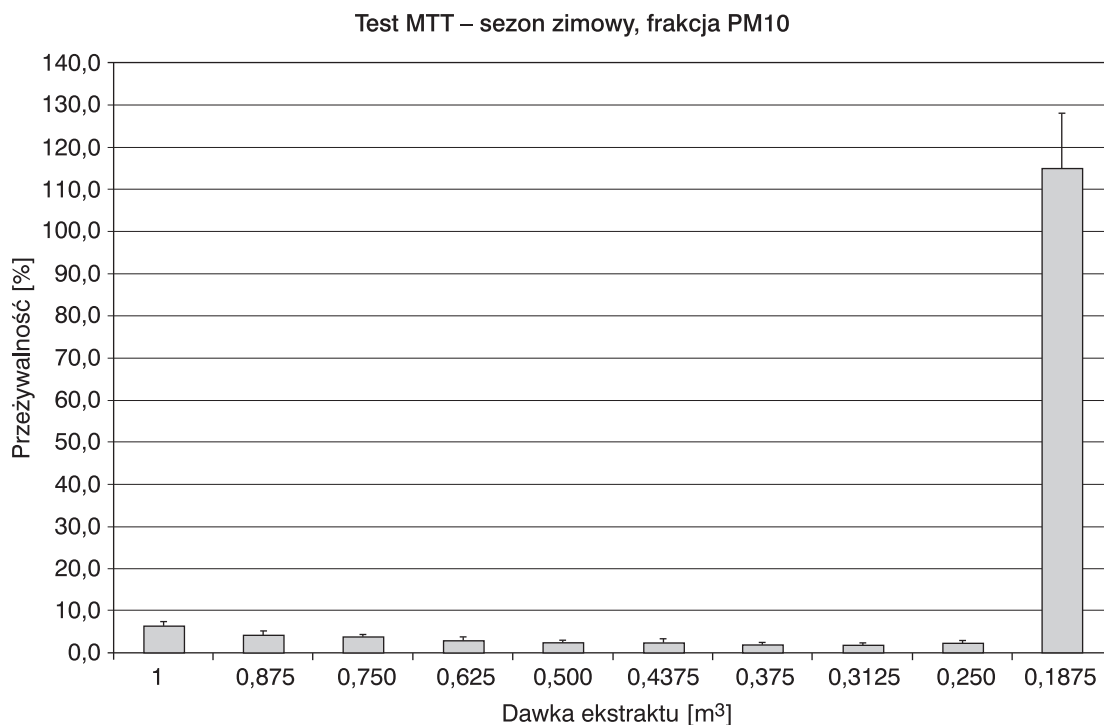
Rycina 3. Wyniki testu MTT oszacowane w zależności od dawki ekstraktu pyłowych zanieczyszczeń powietrza frakcji PM10 pobranego w sezonie jesiennym

Figure 3. MTT assay results of PM10 fraction of dust extracts collected in autumn



Rycina 4. Wyniki testu MTT oszacowane w zależności od dawki ekstraktu pyłowych zanieczyszczeń powietrza frakcji PM2,5 pobranego w sezonie zimowym

Figure 4. MTT assay results of PM2.5 fraction of dust extracts collected in winter



Rycina 5. Wyniki testu MTT oszacowane w zależności od dawki ekstraktu pyłowych zanieczyszczeń powietrza frakcji PM10 pobranego w sezonie zimowym

Figure 5. MTT assay results of PM10 fraction of dust extracts collected in winter

w stosunku do wartości dopuszczalnych stężenia poszczególnych frakcji. Podwyższone stężenia frakcji PM10 i PM2,5 występują bardzo często na obszarze Aglomeracji Śląskiej, co jest potwierdzone w pracach naukowych badaczy prowadzących pomiary na obszarze dużych aglomeracji miejskich [2, 4, 5, 15, 21, 53].

Mając na uwadze aktualny stan wiedzy na temat mutagennego i toksycznego oddziaływania drobnych cząstek pyłu w szczególności na organizmy żywe należy znacznie rozszerzyć badania powietrza o zaprezentowane w pracy testy. Interesujące jest więc zastosowanie m.in. testu MTT do tego typu badań, gdyż złożona mieszanina o nieznanym potencjale rakotwórczym, jaką jest powietrze, wykazująca aktywność w testach mutagenności, stanowi prawdopodobnie ryzyko wystąpienia chorób nowotworowych ludzi. Konieczne jest zatem kontynuowanie badań biologicznych i uzupełnienie monitoringu powietrza o testy bioindykacyjne.

Wnioski

1. Wyniki testu Ames przy użyciu szczepu TA98 badanych ekstraktów pochodzących z sezonu jesiennego i zimowego wykazały, że efekt mutagenny wywołują głównie związki o działaniu pośrednim, wymagające aktywacji metabolicznej.
2. Wyniki testu Ames przeprowadzone z wykorzystaniem szczepu YG1041 potwierdzają obecność nitrowych pochodnych WWA w aerozolu atmosferycznym frakcji PM2,5 i PM10 z jesiennego i sezonu zimowego.
3. Zastosowanie testu MTT z wykorzystaniem komórek makrofagów mysich RAW 264.7 umożliwiło ocenę cytotoxyczności pyłowych zanieczyszczeń powietrza frakcji PM10 i PM2,5.
4. Badania prowadzone testem MTT wskazują na duże zróżnicowanie w przeżywalności makrofagów w stosunku do zastosowanej dawki pyłowych zanieczyszczeń oraz występuje zróżnicowanie między badanymi frakcjami.
5. Przeprowadzone badania wskazują, iż pyłowe zanieczyszczenia powietrza pochodzące z sezonu grzewczego jesienno – zimowego cechują się wysokimi właściwościami mutagennymi i cytotoxycznymi.
6. Zastosowanie hodowli komórkowych wraz z testem bakteryjnym stwarza możliwość otrzymania prawidłowej odpowiedzi związanej z reakcją komórek ssaków na związki mutagenne i cytotoxyczne zawarte w aerozolu atmosferycznym.

Dziękujemy pracownikom Zakładu Szkodliwosci Biologicznych i Immunoalergologii za pobór próbek pyłowych zanieczyszczeń powietrza.

Praca zrealizowana w ramach działalności statutowej (numer tematu ZTG-3) Instytutu Medycyny Pracy i Zdrowia Środowiskowego

Wykaz piśmiennictwa

1. Piekarska K., Karpińska – Smulikowska J.: Wpływ indukcji frakcji mikrosomalnej na wykrywalność mutagennych zanieczyszczeń powietrza frakcji PM10 bakteryjnym testem Ames. Cytowane w pracy zbiorowej pod redakcją Anny Matusiak-Piotrowskiej i Jana Rutkowskiego: Ochrona powietrza atmosferycznego. Osiągnięcia w nauce, energetyce i przemyśle. Politechnika Wroclawska, 863: 175-180, Wroclaw 2006.
2. Kleinowski K., Błaszczyk J.: Zanieczyszczenie powietrza pyłem PM2,5 w Aglomeracji Górnośląskiej, ocena poziomu narażenia na bazie indeksu AQI. Cytowane w pracy zbiorowej pod redakcją Jana Koniecznyńskiego. Ochrona powietrza w teorii i praktyce, 2: 147-156. Wydawnictwo IPI PAN, Zabrze 2006.
3. Adamiak W., Kołwzan B.: Bioindykatory zanieczyszczeń atmosfery. Cytowane w pracy zbiorowej pod redakcją Jerzego Zwoździaka: Człowiek, Środowisko, Zagrożenie, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wroclawskiej, 147-163, Wroclaw 2002.
4. Pastuszka J.S., Rogula-Kozłowska W.: Badanie parametrów optycznych pyłu respirabilnego w pobliżu skrzyżowania ruchliwych ulic. Materiały konferencyjne III Ogólnopolskiego Kongresu Środowiska, Politechnika Lubelska, 2:145-152, Lublin 2009.
5. Kozielska B., Kozłowska Rogula W., Pastuszka J.S.: Wpływ ruchu drogowego na stężenia PM2,5, PM10 i WWA w warunkach wysokiej i niskiej emisji komunikacyjnej. Materiały konferencyjne III Ogólnopolskiego Kongresu Środowiska, Politechnika Lubelska, 1:129-137, Lublin 2009.
6. Mielżyńska D., Siwińska., Kapka L.; Efekt mutagenny frakcji PM10 pyłów zawieszonych na obszarze województwa śląskiego. Materiały konferencyjne V Krajowej Konferencji Polskiego Towarzystwa Medycyny Środowiskowej. Medycyna Środowiskowa, 5, 1: 57-58, Sosnowiec 2002.
7. Kołwzan B., Pawlaczyk-Szpilowa M., Adamiak W.: Bioindykacja zanieczyszczeń mutagennych i rakotwórczych w próbach środowiskowych. Cytowane w pracy zbiorowej pod redakcją Jerzego Zwoździaka: Człowiek, środowisko, zagrożenie. Oficyna Wydawnicza Politechniki Wroclawskiej, 165-181, Wroclaw 2002.
8. Mielżyńska D., Siwińska., Kapka L.; Efekt mutagenny pyłów zawieszonych jako wskaźnik jakości powietrza. Wydawnictwo IMPiZS, Sosnowiec 2002.
9. Kapka L., Zemła B.F., Kozłowska A., Olewińska E., Pawlas N.; Jakość powietrza atmosferycznego a zapadalność na nowotwory płuc w wybranych miejscowościach i powiatach województwa śląskiego. PZH, Przegląd Epidemiologiczny, 63, 3: 437-442, Warszawa 2009.
10. Banasik S., Danecki R., Holecki A., Kiszka I., Pilich-Konieczny A., Szymańska-Kubicka L., Kucharczyk B., Piszczek S., Plevnia B., Radecki R., Rasała J., Straszak K., Szczygieł A., Szumowska A., Ślęzański M., Tsarczyk R., Dziekońska D., Głubiak-Witwicka E., Włoch D.: Krajowy Raport Mosaikowy o stanie środowiska – województwo śląskie. Wojewódzki Inspektorat Ochrony Środowiska, Katowice 2009.
11. Kozłowska A., Kapka L., Jasiński R.: Analiza efektu mutagennego przechowywanych ekstraktów pyłowych zanieczyszczeń powietrza w wybranych miastach województwa śląskiego. Medycyna Środowiskowa, 10, 2: 68-75, Sosnowiec 2007.

12. Jadczyk P.: Mutagenność pyłowych zanieczyszczeń powietrza w środowisku miejskim. Rozprawa doktorska. Politechnika Wroclawska, Wrocław 2000.
13. Gawlik M.B., Bilek M.: Możliwości obniżenia emisji wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych ze źródeł antropogenicznych. *Medycyna Środowiskowa*, 9, 1: 73-76, Sosnowiec 2006.
14. Zaciera M., Mniszek W., Smolik E.: Kryteria szkodliwości spalin z silników Diesla. Cytowane w pracy zbiorowej pod redakcją Marty Janosz – Rajczyk: *Mikrozanieczyszczenia w środowisku człowieka*. Wydawnictwo Politechniki Częstochowskiej, 141-149, Częstochowa 2002.
15. Piekarska K.: Efekt mutagenowy głównych grup zanieczyszczeń organicznych zaadsorbowanych na cząstkach pyłu zawieszonego PM10 i PM2,5 pobranego na terenie Wrocławia. Cytowane w pracy zbiorowej pod redakcją Anny Matusiak-Piotrowskiej i Jana Rutkowskiego: *Aktualne problemy w ochronie powietrza atmosferycznego*. Wydawnictwo PZITS, 880: 129-134, Wrocław 2008.
16. Piekarska K., Zaciera M., Czarny A., Zaczyńska E.: Zastosowanie testów krótkoterminowych do oceny stopnia skażenia powietrza atmosferycznego. Cytowane w pracy zbiorowej pod redakcją Anny Matusiak-Piotrowskiej i Jana Rutkowskiego: *Współczesne osiągnięcia w ochronie powietrza atmosferycznego*. Wydawnictwo PZITS, 893: 293-306, Wrocław 2010.
17. Majewski G., Łykowski B.: Skład chemiczny pyłu zawieszonego w aglomeracji warszawskiej. *Acta Scientiarum Polonorum, Formatio Circumiectus*, 7, 1: 81-96, 2008.
18. Piekarska K., Zaciera M., Czarny A., Zaczyńska E.: Właściwości mutagenne i cytotoksyczne ekstraktów pyłu zawieszonego pobranego na terenie Wrocławia. Cytowane w pracy zbiorowej pod redakcją Barbary Kołwzan i Kazimierza Grabasa: *Ekotoksykologia w ochronie środowiska*. PZITS, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, 303-312, Wrocław 2008.
19. Kapka L., Mielżyńska D., Siwińska E.: Ocena sezonowej i przestrzennej zmienności stężeń PM10 oraz wybranych WWA w powietrzu atmosferycznym województwa śląskiego. *Medycyna Środowiskowa*, 7, 1: 25-31, Sosnowiec 2004.
20. Piekarska K.: Modyfikacja testu Salmonella do oceny mutagenności pyłowych zanieczyszczeń powietrza. Wydawnictwo Politechniki Wrocławskiej, Monografia 52: 16-179, Wrocław 2008.
21. Piekarska K., Zaciera M.: Mutagenność zanieczyszczeń organicznych zaadsorbowanych na cząstkach pyłu frakcji PM10 i PM2,5 pobranego na terenie Wrocławia. *Medycyna Środowiskowa*, 11, 1: 27-34, Sosnowiec 2008.
22. Karpińska-Smulikowska J., Piekarska K.: Obecność zanieczyszczeń genotoksycznych w powietrzu atmosferycznym na terenie miasta Wrocławia. *Medycyna Środowiskowa*, 7, 1: 25-31, Sosnowiec 2004.
23. Jadczyk P.: The effect of traffic in the Wrocław town centre on the mutagenicity of airborne particulate matter. *Acta Poloniae Toxicologica*, 9, 1: 57-67, 2001.
24. Jadczyk P.: Korelacje między mutagennością pyłu zawieszonego a stężeniami zanieczyszczeń w atmosferze. *Rocznik PZH*, 52, 1: 25-33, Warszawa 2001.
25. Zaciera M., Mniszek W.: Oznaczanie nitrowych pochodnych WWA w powietrzu. Cytowane w pracy zbiorowej pod redakcją Marty Janosz-Rajczyk: *Mikrozanieczyszczenia w środowisku człowieka*. Wydawnictwo Politechniki Częstochowskiej, 385-391, Częstochowa 2004.
26. Mielżyńska D., Siwińska E., Bubak A.: Genotoksyczność 13 wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w wybranych systemach in vitro. Wydawnictwo IMPiZŚ, Sosnowiec 1998.
27. Sapota A.: Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (substancje smołowe rozpuszczalne w cykloheksanie). Dokumentacja proponowanych wartości dopuszczalnych poziomów narażenia zawodowego. *Podstawy i Metody Oceny Środowiska Pracy*, 2, 32: 179-208, 2002.
28. Smolik Ewa: Wielopierścieniowe Węglowodory Aromatyczne. http://www.srodowiskoazdrowie.pl/wpr/Dokumenty/Materialy_szkoleniowe/Szkol12/10-smolik.pdf.
29. Ćwiklak K. 2006.: Występowanie WWA w powietrzu wybranych miast Małopolski. Cytowane w pracy zbiorowej pod redakcją Jana Konieczynskiego. *Ochrona powietrza w teorii i praktyce*, 2: 43-52. Wydawnictwo IPIŚ PAN, Zabrze 2006.
30. Uchwała Sejmiku Województwa Śląskiego nr III/52/15/2010 z dnia 16.06.2010 w sprawie podjęcia „Programu ochrony powietrza dla stref województwa śląskiego, w których stwierdzone zostały ponadnormatywne poziomy substancji w powietrzu”. Załącznik nr 2010/07/10 do uchwały nr III/52/15/2010.
31. Mertelmans K., Zeiger E.: The Ames Salmonella/microsome mutagenicity test. *Mutation Research*, 455: 29-60, 2000.
32. Claxton L.D., Matthews P.P., Warren S.H.: The genotoxicity of ambient outdoor air, a review: Salmonella mutagenicity. *Mutation Research*, 567: 347-399, 2004.
33. Hagiwara Y., Watanabe M., Oda Y., Sofuni T., Noemi T.: Specificity and sensitivity of Salmonella typhimurium YG1041 and YG1042 strains possessing elevated levels of nitroreductase and acetyltransferase activity. *Mutation Research*, 291: 171-180, 1993.
34. Piekarska K., Zaciera M., Czarny A., Zaczyńska E.: Mutagenic and cytotoxic properties of extracts of suspended particulate matter collected in Wrocław city area. *Environment Protection Engineering*, 35, 1: 37-48, 2009.
35. Brits E., Schoeters G., Varschaeve L.: Genotoxicity of PM10 and extracted organic collected in an industrial, urban and rural area in Flanders, Belgium. *Environment Research*, 96: 109-118, 2004.
36. Traversi D., Degan R., De Marco R., Gilli G., Pignata C., Villani S., Bono R.: Mutagenic properties of PM2.5 urban pollution in the Northern Italy: The nitro-compounds contribution. *Environment International*, 35: 905-910, 2009.
37. Piekarska K., Karpińska – Smulikowska J.: Sezonowa zmienność w mutagenności powietrza wrocławskiego. *Polish Journal of Environmental Studies*, 16, 3B: 408-413, 2007.
38. Piekarska K., Karpińska – Smulikowska J.: Mutagenic activity of environmental air samples from the area of Wrocław. *Polish Journal of Environmental Studies*, 16, 5: 757-764, 2007.
39. Piekarska K.: Mutagenic effect of main groups of organic pollutants adsorbed on suspended particulate matter (PM10 and PM2,5) collected within Wrocław urban area. *Environment Protection Engineering*, 35, 1: 23-35, 2009.
40. Piekarska K., Karpińska-Smulikowska J.: Zastosowanie testu preinkubacyjnego jako metody zwiększenia wykrywalności mutagennych zanieczyszczeń powietrza aglomeracji miejskiej bakteryjnym testem Ames (testem Salmonella). *Medycyna Środowiskowa*, 9, 2: 87-95, Sosnowiec 2006.
41. Piekarska K., Karpińska-Smulikowska J.: Effect of microsomal fraction induction on the detectability of mutagenic air pollutants by means of the Ames bacterial mutagenicity test. *Environment Protection Engineering*, 32, 4: 15-23, 2006.
42. Brzuzan P., Woźny M., Łuczyński M.K.: Toksykologia molekularna, przewodnik do ćwiczeń, Uniwersytet Warmiński Mazurski, 1-75, Olsztyn 2007.

43. Czarny A., Zaczyńska E., Janicka A., Szczepaniak W., Wal-kowiak W.: Wpływ wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych na produkcję TNF-a przez ludzkie komórki płuc, in vitro. Cytowane w pracy zbiorowej pod redakcją Barbary Kołwzan i Kazimierza Grabasa: Ekotoksykologia w ochronie środowiska. PZITS, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, 27-44, Wrocław 2008.
44. Maron D.M., Ames B.N.: Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research*, 113: 173-215, 1983.
45. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 28 lipca 2003 r. w sprawie metod przeprowadzania badań właściwości fizyko-chemicznych, toksyczności i ekotoksyczności substancji i preparatów chemicznych (Dz. U. Nr 232 z 2003 r. poz. 2343).
46. Traczewska T.M.: Metody biologiczne w kontroli jakości wody. Cytowane w pracy zbiorowej pod redakcją Barbary Kołwzan i Kazimierza Grabasa: Ekotoksykologia w ochronie środowiska. PZITS, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, 435-442, Wrocław 2008.
47. Zwoździak J., Zwoździak A.: Charakterystyka i zmienność stężeń pyłów PM10 i PM2,5 w atmosferze we Wrocławiu. Cytowane w pracy zbiorowej pod redakcją Anny Matusiak – Piotrowskiej i Jana Rutkowskiego: Ochrona powietrza atmosferycznego. Osiągnięcia w nauce, energetyce i przemyśle. Politechnika Wroclawska, 863: 239-242, Wrocław 2006.
48. Ames B.N., McCann J., Yamasaki E.: Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian – microsome mutagenicity test. *Mutation Research*, 31: 347-364, 1975.
49. Gregoraszczyk EŁ. Hodowla in vitro w toksykologii. w Stokłosowa S. „Hodowla komórek i tkanek”, PWN, Warszawa 2006, str 241– 255.
50. Mosmann T: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 1983, 65, 55-63.
51. Jalava P.I., Salonen R.O., Pennanen A.S., Happonen M.S., Penttinen P., Hälinen A.I., Sillanpää M., Hillamo R., Hirvonen M.R.: Effects of solubility of urban air fine and coarse particles on cytotoxic and inflammatory responses in RAW 264.7 macrophage cell line. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 229:146 -160, 2008.
52. Poma A., Limongi T., Pisani C., Granato V., Picozzi P.: Genotoxicity induced by fine Urban air particulate matter in the macrophages cell line RAW 264.7. *Toxicological In Vitro*, 20, 6:1023-1029, 2006.
53. Kapka L., Pawlas N., Olewińska E., Kozłowska A., Górny R.L.: Analiza właściwości cytotoksycznych pyłów zawieszonych pobranych w wybranych miejscowościach województwa śląskiego badanych z wykorzystaniem linii makrofagów mysich RAW 264.7. *Medycyna Środowiskowa*, 11, 1: 19-26, Sosnowiec 2008.
54. www.chem.pg.gda.pl/Katedry/Leki_Biochemia/dydaktyka/kultury_tkankowe_aktywnosci_cytotoksycznej_chemoterapeutykow_wobec_komorek_nowotworowych.pdf
55. Sówka I., Zwoździak A., Trzeplak-Nabaglo K., Skrętowicz M., Zwoździak J.: Identyfikacja źródeł emisji pyłów PM2,5 w obszarze tła miejskiego Wrocławia. Cytowane w pracy zbiorowej pod redakcją Anny Matusiak – Piotrowskiej i Jana Rutkowskiego: Współczesne osiągnięcia w ochronie powietrza atmosferycznego. Wydawnictwo PZITS, 893: 351-356, Wrocław 2010.
56. Gilli G., Traversi D., Rovere R., Pignata C., Schiliro T.: Airborne particulate matter: Ionic species role in different Italian sites. *Environment Research*, 103, 1: 1-8, 2007.
57. Klejnowski K., Krasa A., Rogula-Kozłowska W.: Badania składu frakcyjnego pyłu zawieszzonego w Zabrze. Cytowane w pracy zbiorowej pod redakcją Anny Matusiak – Piotrowskiej i Jana Rutkowskiego: Aktualne problemy w ochronie powietrza atmosferycznego. Wydawnictwo PZITS, 880: 79-82, Wrocław 2008.
58. Santini M.T., Rainaldi G., Ferrante A.: Environmental fine particulate matter (PM2.5) activates hte RAW 264.7 macrophage cell line event at very low concentrations as revealed by IH NMR. *Chem. Res. Toxicology*, 17:63-74, 2004.
59. Jalava P.I., Salonen R.O., Pennanen A.S., Sillanpää M., Hälinen A.I., Happonen M.S., Hillamo R., Brunekreef B., Katsoyanni K., Sunyer J., Hirvonen M.R.: Heterogeneities in inflammatory and cytotoxic responses of RAW 264.7 macrophage cell line to urban air coarse, fine and ultrafine particles from six European sampling campaigns. *Inhalation Toxicology* 19, 3: 213-225, 2007.

Adres do korespondencji:
 mgr inż. Agnieszka Kozłowska
 Zakład Szkodliwości Chemicznych
 i Toksykologii Genetycznej
 Pracownia Toksykologii Genetycznej
 Instytut Medycyny Pracy i Zdrowia Środowiskowego
 ul. Kościelna 13, 41-200 Sosnowiec
 tel: 32 634 11 94; fax: 32 266 11 24
 e-mail: a.kozłowska@imp.sosnowiec.pl